

# 1 Einleitung

## 1.1 Knorpelgewebe im adulten Organismus

Knorpelgewebe wird zu den Binde- und Stützgeweben gezählt und entstammt dem Mesenchym (embryonales Bindegewebe). Die einzelnen Knorpelstücke sind, abgesehen von den freien Gelenkoberflächen und den Verwachsungsbereichen mit den Knochen, von einer festen faserigen Bindegewebsschicht umhüllt, die als Perichondrium bezeichnet wird. Von der chondrogenen Innenschicht des Perichondriums aus findet während der Entwicklung die Knorpelbildung statt. In erster Linie ist von hier aus auch im Erwachsenenalter eine gewisse Regeneration möglich. Drei verschiedene Knorpelarten finden sich im humanen adulten Organismus (Putz R, 1994):

### Faserknorpel

Im Faserknorpel finden sich hauptsächlich Kollagenfasern vom Typ I. Es handelt sich dabei um dichtes reißfestes Bindegewebe aus welchem der Anulus fibrosus des Discus intervertebralis, die Symphysis pubica, Anteile der Menisci sowie Gelenkkörper und Disci von Kiefer- und Schlüsselbeingelenken bestehen.

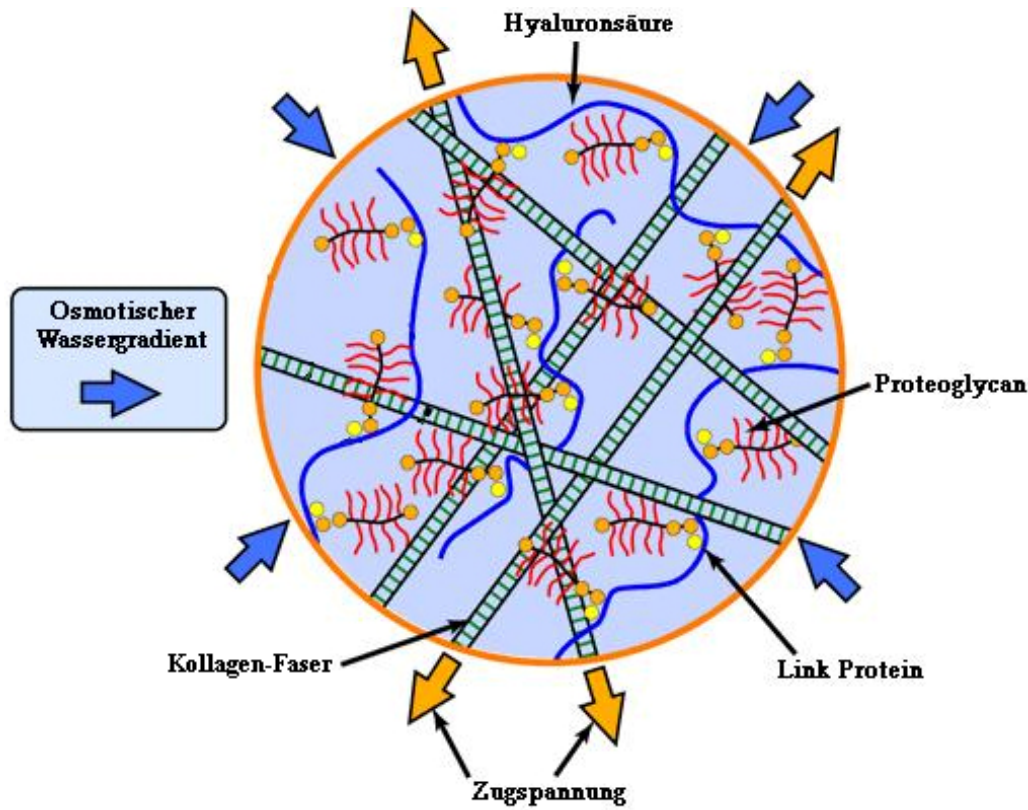
### Elastischer Knorpel

Der elastische Knorpel ist von einem Netz elastinhaltiger Fasern durchzogen, die ihm eine elastische Konsistenz geben. Er formt das Gerüst vom Cartilago auricularis, der Epiglottis und dem Proc. vocalis der Cartilago arytenoidea.

### Hyaliner Knorpel

Der hyaline Knorpel besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ II, Hyaluronsäure und Proteoglycan. Die Proteoglycane sind über Linkproteine an die Hyaluronsäuremoleküle gebunden (Abb. 1) (Hardingham, 1998). Diese Konstruktion hat die Eigenschaft besonders viel Wasser an sich zu binden und zeichnet sich durch besondere Druckfestigkeit aus. Das embryonale Skelett besteht zeitweise aus hyalinem Knorpel. Während der Wachstumsphase bildet es die Epiphysenfugen und im adulten Organismus die Gelenkflächen aller Diarthrosen. Außerdem bildet hyaliner Knorpel die Cartilagine costales, die Synchrondrosis manubriosternalis, den Proc. xiphoideus, die Synchrondrosis spheno-occipitalis, das Cornu minus des Zungenbeins, das Knorpelskelett der Nase und Nasenscheidewand, das Kehlkopfskelett und die Knorpelspannen von Trachea und

Bronchien. Hyaliner Knorpel ist ein gefäßloses und nervenfreies Gewebe, das ausschließlich durch Diffusion von benachbarten Geweben und der Synovialflüssigkeit ernährt wird.

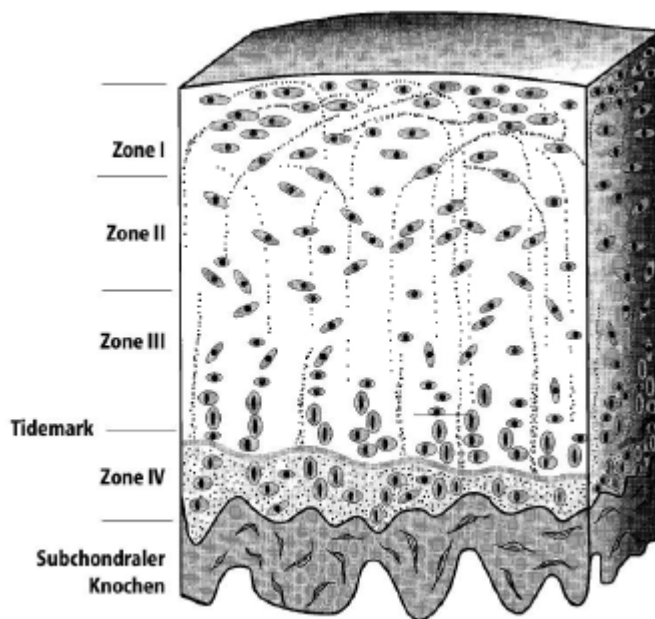


*Abb. 1: Die außerordentliche Druckfestigkeit hyalinen Knorpels entsteht durch das zugfeste Kollagenfasernetzwerk und dem osmotisch stark wirksamen an Hyaluronsäure gekoppelten Proteoglycan (Hardingham, 1998).*

Der Gelenkknorpel lässt sich histologisch in vier Zonen unterteilen (Abb. 2) (Buckwalter und Mankin, 1998):

- Zone I wird von der Tangentialfaserzone gebildet, in der die spindelförmigen Knorpelzellen parallel zur Oberfläche angeordnet sind. Die Kollagenfasern zeigen ebenfalls diesen Verlauf und bilden Arkaden, die in die tiefer liegenden Zonen hinunterziehen. Während der Kollagengehalt hier sehr hoch ist, ist die Konzentration der Proteoglycane niedrig.
- Zone II wird auch als Übergangszone bezeichnet, da sich die Zellen runder präsentieren und sich zu so genannten Chondronen zusammenlagern. Der Gehalt an Proteoglycanen ist im Vergleich zu Zone I höher.

- Zone III ist die breite Radiärzone, in der sich die Chondrozyten zu Säulen anordnen. Zwischen diesen Anordnungen verlaufen starke Kollagenfaserbündel. Vergleichsweise findet sich hier die höchste Konzentration an Proteoglycanen.
- Zone IV ist der Übergang zum subchondralen Knochen und wird als Zone des mineralisierten Knorpels bezeichnet, da hier bereits Calciumkristalle in die extrazelluläre Matrix eingelagert sind. Histologisch lässt sich zwischen der Zone III und der Zone IV eine basophile Grenzlinie erkennen, die man „Tidemark“ nennt, deren Funktion aber noch nicht völlig geklärt ist.



*Abb. 2: Zonen des Gelenkknorpels im Querschnitt nach Buckwalter: Zone I (Tangentialfaserzone), Zone II (Übergangszon), Zone III (Radiärzone), Zone IV (Zone des mineralisierten Knorpels). Die gestrichelten Linien zeigen den arkadenartigen Verlauf der Kollagenfasern. Die Chondrozyten sind entlang dieser Fasern in den einzelnen Schichten ausgerichtet (Buckwalter und Mankin, 1998).*

## 1.2 Degenerative Veränderungen von Gelenkknorpel

Unter physiologischen Bedingungen unterstehen die Chondrozyten einem Gleichgewicht anaboler und kataboler Aktivitäten, welche die strukturelle und funktionelle Integrität der extrazellulären Knorpelmatrix reguliert. Verschiedene Mechanismen können dieses Gleichgewicht zugunsten der katabolen Aktivitäten verschieben, was dann zur Degeneration extrazellulärer Matrix führt. Zu den wichtigsten Mechanismen dieses multifaktoriellen Geschehens gehören (Goldring et al.; 2004):

- Erworbene oder altersbezogene Veränderungen der Chondrozytenfunktionen.
- Dysregulierte Zytokinaktivitäten zugunsten katabolischer Zytokine, wobei noch antikatabolische und anabolische Zytokine unterschieden werden.
- Mechanische Über- oder Unterbelastung des Knorpels (Carter et al., 2004).

Häufige chronische Erkrankungen beim Menschen, welche mit Degeneration des Gelenkknorpels einhergehen, sind Arthrose (Osteoarthritis) und die rheumatoide Arthritis. Obwohl in ihrer Ätiologie und ihrem Verlauf sehr unterschiedlich, zeigen Sie einige pathogenetische Gemeinsamkeiten, wie z.B. die Aktivierung inflammatorischer Zytokine durch die Synovialis, welche im Zuge kataboler Kaskaden zu einer Knorpeldegeneration führen (Reines, 2004). Auch das vorzeitige Altern und Dedifferenzieren von Knorpelzellen, zunehmend als wichtiger pathogenetischer Faktor bei Arthrose anerkannt, wird von Reines et al. als möglicherweise wichtige Teilursache für die Degeneration bei rheumatoider Arthritis angeführt. Wichtigste Ursachen chronischer mechanischer Überbelastung des Knorpels sind posttraumatische und angeborenen Fehlstellungen des Gelenkes, die häufig zu Arthrose führen (Carter et al., 2004).

### **1.3 Regenerationspotential von Gelenkknorpel bei degenerativen Erkrankungen**

Da hyaliner Gelenkknorpel zu den braditrophen Geweben zählt und nicht von Perichondrium überzogen wird, ist seine Regenerationsfähigkeit sehr gering. Allerdings konnten in der Synovialflüssigkeit chronisch erkrankter humaner Gelenke mesenchymale Vorläuferzellen identifiziert werden, welche als regenerative Reaktionen des Organismus interpretiert werden könnten (Jones et al., 2004). Bei Arthrose fanden sich in dieser Studie im Mittel 37 mesenchymale Vorläuferzellen/ml, bei rheumatoider Arthritis deutlich weniger, nämlich 2 Zellen/ml. Allerdings fehlen Angaben zur Anzahl mesenchymaler Vorläuferzellen im gesunden Gelenk. Erfahrungsgemäß lässt sich die Degeneration des Knorpels bei diesen Erkrankungen jedoch weder medikamentös noch chirurgisch wirkungsvoll aufhalten oder umkehren (Schurman und Smith, 2004). Die degenerativen Prozesse überwiegen hier also bei weitem jegliche regenerative Bemühungen des Körpers.

## **1.4 Die Rolle von Hyaluronsäure bei der Therapie degenerativer Knorpelkrankungen**

Kontrovers wird die Therapie von degenerativen Gelenkerkrankungen mittels intraartikulären Hyaluronsäure-Injektionen nach den Konzepten von Balazs und Denlinger diskutiert (Balazs und Denlinger, 1989). Metaanalysen berichten sowohl von kaum nachweisbarem therapeutischen Nutzen (Lo et al., 2003) als auch von gutem therapeutischen Nutzen durch deutliche Schmerzlinderung und verbesserte Funktionalität der betroffenen Gelenke (Maheu et al., 2002; Wang et al., 2004). Asari und Miauchi stellen zahlreiche Daten vor, welche die physikalisch bedingten protektiven Eigenschaften von Hyaluronsäure auf den Gelenkknorpel, die Effekte von Hyaluronsäure auf arthritische Synovialis und den Einfluss von Hyaluronsäure auf zellphysiologische Aktivitäten beschreiben (Asari und Miauchi, 2000). So konnte gezeigt werden, dass Hyaluronsäure die Proliferation von Synovialzellen und deren Sekretion von Interleukin-1 $\beta$ , Matrix-Metalloproteinase-3 und Prostaglandin-E2 unterdrückt. Eine Hyperproliferation der Synovialis mit einer Überproduktion der genannten Faktoren sind typische Merkmale von Arthrose und rheumatoider Arthritis. Dabei führt Interleukin-1- $\beta$  insbesondere bei rheumatoider Arthritis zu einer erniedrigten Proteoglycan-Synthese. Matrix-Metalloproteinase-3 forciert den enzymatischen Knorpelabbau. Prostaglandin-E2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Schmerzvermittlung. Von Bedeutung sind in diesem Zusammenhang sicher auch die Interaktionen von Hyaluronsäuren mit verschiedenen Zellrezeptoren im Gelenk, auf die später noch genauer eingegangen werden wird (Kap. 1.11.2, S. 34).

## **1.5 Traumatologische Gelenkknorpeldefekte**

Aus einem anderen Blickwinkel sind traumatologisch verursachte Knorpeldefekte zu betrachten. Mittel- und langfristig führen solche Verletzungen aber häufig auch zu Arthrose (Buckwalter und Brown, 2004).

Gelenkknorpelverletzungen kann man grob in drei Typen einteilen (Buckwalter, 2002):

- Verletzungen der Gelenkoberfläche, die keine sichtbaren Unterbrechungen der Gelenkoberfläche zeigen, aber einen Knorpelschaden mit eventueller Beteiligung subchondralen Knorpels aufweisen.
- Chondrale Defekte (partial-thickness-Defekte) bei denen lediglich die Knorpelschicht betroffen ist, ohne dass dabei der darunter liegende Knochen verletzt ist.

- Osteochondrale Defekte (full-thickness-Defekte) mit einer Schädigung bis in den subchondralen Knochen hinein.

## 1.6 Regenerationsmechanismen traumatologischer Gelenkknorpeldefekte

Knorpelverletzungen, welche nicht zu einer Unterbrechung der Gelenkoberfläche führen, durchlaufen in den meisten Fällen einen vollständigen Regenerationsprozess (Buckwalter, 2002). Voraussetzung dafür ist, dass die Chondrozyten den degenerativen Proteoglycanabbau ausgleichen können und das Kollagenfasernetzwerk noch ausreichend intakt ist.

Bei reinen Knorpeldefekten kommt es im Grenzbereich des geschädigten Knorpels zum Zelluntergang und zu einer Degeneration der Knorpelmatrix (Fuller und Ghadially, 1972). Bei benachbarten Knorpelzellen induziert dies eine vermehrte Syntheseleistung und Zellteilung. Es entstehen neue Zellgruppen, die vermehrt Extrazellulärmatrix bilden. Der noch vorhandene Knorpel wird so neu strukturiert und in seiner Architektur den durch Substanzverlust veränderten Belastungen angepasst. Wichtig zu bemerken ist hierbei, dass der Gewebeerlust nicht ausgeglichen wird.

Osteochondrale Defekte zeigen eine bessere Regenerationsfähigkeit. Durch die Eröffnung des Knochenmarkraums kommt es unmittelbar nach der Schädigung zu einer Füllung des Defektes durch geronnenes Blut und Knochenmark (Shapiro et al., 1993; Buckwalter, 2002). Nach ein bis zwei Tagen ist die Oberfläche dieses Blutpfropfes bereits mit fibrinoidem Material bogenförmig von Defektkante zu Defektkante überspannt. Thrombozyten dieses Blutpfropfes setzen vasoaktive Mediatoren und diverse Wachstumsfaktoren, wie z.B. Transforming Growth Factor- $\beta$  frei. Diese stimulieren möglicherweise die folgende Vaskularisierung und Migration mesenchymaler Stammzellen in den Defekt, sowie deren Differenzierung zu Knochen und Knorpel. In den folgenden Tagen ordnen sich spindelförmige Stammzellen parallel zur Oberfläche des Defektes an, wobei sie sich scheinbar an den fibrinoiden Fasern orientieren. Das geronnene Blut wird resorbiert und mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks füllen zunehmend den gesamten Defekt aus (Buckwalter, 2002). Nach etwa drei Wochen hat sich die oberste Zellschicht zu fibroblastartigen Zellen differenziert und imponiert wie Faserknorpel. Die darunter liegenden Zellen des Defekts durchlaufen eine chondrogene Differenzierung und beginnen Knorpelmatrix zu produzieren. Im Knocheniveau des Defekts kommt es im weiteren Verlauf zur Hypertrophie und Verkalkung der differenzierten Zellen. Es bildet sich enchondraler Geflechtknochen, der den fehlenden subchondralen Knochen ersetzt. In der vierten bis achten Woche erscheint der neu

gebildete Knorpel lichtmikroskopisch und histochemisch wie ein Intermediat zwischen hyalinen Knorpel und Faserknorpel, bedeckt von einer wie Faserknorpel imponierenden Schicht. Nur in seltenen Fällen kommt es zu einer dauerhaften Bildung einer funktionellen Gelenkoberfläche. Der durch Zelluntergang und Degeneration der Knorpelmatrix gekennzeichnete Grenzbereich des Defektes nimmt nicht an den beschriebenen Regenerationsprozessen teil. Alter und neuer Gelenkknorpel finden also häufig nicht zu einander, was mitunter zu lichtmikroskopisch erkennbaren Lückenbildungen führt. Der neu gebildete Knorpel hat eine geringere Festigkeit und höhere Permeabilität als normaler Gelenkknorpel und weist auch im Faserverlauf deutliche Unterschiede auf. Dies führt bei Belastung zu einer schlechteren Druckverteilung, die zu einer schnellen Degeneration der frisch differenzierten Chondrozyten führt. Bereits nach der zwölften Woche zeigt sich häufig eine Abnahme der Zellen und der Proteoglycane in den obersten Schichten, gefolgt von vertikalen Fissuren durch alle Schichten hindurch. Auch Unterschiede zwischen dem neu gebildeten und dem ursprünglichen subchondralen Knochen könnten die Degeneration fördern, wie es beispielsweise bei Patienten mit Osteonekrose beobachtet werden kann.

## **1.7 Chirurgische Verfahren bei der Therapie von Gelenkknorpeldefekten**

### **1.7.1 Ziele und Strategien**

Ziel der chirurgischen Verfahren ist die Wiederherstellung der Knorpeloberflächenkongruenz, eine normale Gelenkfunktion mit freier schmerzloser Beweglichkeit sowie die Verhinderung der weiteren Knorpeldegeneration. Bei fortgeschrittener Arthrose bleibt letztlich jedoch nur noch die Implantation einer Endoprothese. Aber gerade bei jungen und noch aktiven Patienten ist langfristig die Prognose hinsichtlich der Lockerungshäufigkeit schlecht.

Wenn man die zahlreichen Operationsverfahren betrachtet, die derzeit praktiziert werden, kann man folgende Strategien identifizieren (Buckwalter, 2002; Galois et al., 2004):

- Penetration des subchondralen Knochens
- Autologe und allogene osteochondrale Transplantationen
- Perichondrium- und Periostlappenplastiken
- Methoden des Tissue Engineering

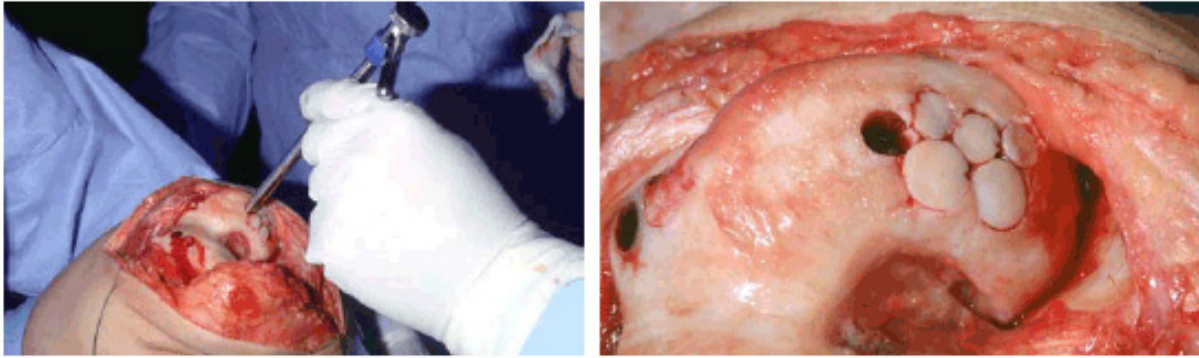
### **1.7.2 Penetration subchondralen Knochens**

Mit der Penetration subchondralen Knochens wird versucht die in Kap. 1.6 beschriebene natürliche Regeneration des Knorpelgewebes zu induzieren und so eine Deckung des Defekts zu erreichen. Zu diesen Techniken zählen die Arthroskopie mit Debridement oder Abrasionarthroplastik, die subchondrale Anbohrung und die Mikrofrakturierung (Resinger et al., 2004). Der Nutzen für Patienten mit degenerativen oder traumatologischen Knorpelschäden bleibt trotz vieler Studien unklar. Keine Studie konnte bisher eine überzeugende Korrelation zwischen der Neubildung von Reparaturknorpel und verminderter Schmerzsymptomatik aufzeigen. Einige Studien beschreiben eine Verbesserung der Symptomatik in der Mehrzahl der Patienten. Andere Studien deuten wiederum an, dass diese Methoden bei Patienten mit Arthrose eher zu einer Verschlechterung der Symptomatik führen können (Buckwalter, 2002). Junge Patienten mit isolierten chondralen oder osteochondralen Defekt profitieren möglicherweise am ehesten von dieser Therapiestrategie, insbesondere wenn dadurch der Einbau einer Endoprothese verzögert werden kann.

### **1.7.3 Osteochondrale Transplantation**

Ein Verfahren Knorpeldefekte mit hyalinen Knorpel zu füllen sind autologe und allogene osteochondrale Transplantationen (Resinger et al., 2004). Bei autologen Transplantaten werden Gewebezylinder aus gering belasteten Knorpelzonen des Kniegelenks für die Einpflanzung in Gelenkknorpeldefekte der Belastungszonen am Kniegelenk oder anderer großer Gelenke genutzt (Abb. 3). Die Anwendung allogener Transplantate bleiben wegen ihrer potentiellen Immunogenität und dem höheren Infektionsrisiko auf Fälle beschränkt, bei denen alternative Verfahren aufgrund der Defektgröße nicht mehr möglich sind.





*Abb. 3: Implantation eines Knorpel-Knochenzylinders mittels Transferhülse (links); Operationsresultat vor Implantation des letzten Autografts in die Belastungszone (rechts).*

Indiziert ist die osteochondrale Transplantation bei fokalen osteochondralen Läsionen, die traumatisch, durch Osteochondrosis dissecans oder andere zirkumskripte Osteonekrosen entstanden sind. Arthrose in dem betroffenen Gelenk stellt in jedem Fall eine Kontraindikation dar. Dieses technisch sehr anspruchsvolle Verfahren zeigte langfristig gute klinische und histologische Ergebnisse (Hangody et al., 1998).

#### **1.7.4 Perichondrium- und Periostlappenplastiken**

In Vergleich zu den osteochondralen Transplantaten, die den Gelenksdefekt bereits mit einem ausgebildeten Gewebe schließen, setzt die Transplantation von Perichondrium oder Periostlappen auf die biologische Potenz dieser Gewebe zur Bildung von hyalinähnlichem Knorpel (Resinger et al., 2004). Perichondrium wird einer sternumnahen Rippe entnommen. Periost wird von der medialen Tibiafläche gewonnen. Die Gewebe werden dann in den Defekt eingenäht oder mittels Fibrinkleber eingeklebt. Indikationen und Kontraindikationen entsprechen denen der osteochondralen Transplantationen. Diese Methoden zeigen zu Beginn gute bis sehr gute, nach mittlerem Nachuntersuchungszeitraum häufig jedoch nur mäßig erfolgreiche Ergebnisse. In mehreren Studien wird berichtet, dass es nach zwei bis fünf Jahren oft zu Ossifikationen und arthrotischen Veränderungen kam. Insgesamt sind die Studienergebnisse jedoch noch uneinheitlich, so dass keine klare Aussage über den klinischen Wert dieser Methoden möglich ist (Gaissmaier et al., 2003).

#### **1.7.5 Methoden des Tissue Engineering bei Knorpeldefekten**

Beim Tissue Engineering werden lebende Zellen des Körpers isoliert und unter Zellkulturbedingungen expandiert (Ringe et al., 2002). Die Zellen werden dann mit biokompatiblen Materialien

kombiniert und gegebenenfalls dem Einfluss von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren ausgesetzt. Dieses Gewebekonstrukt wird dem Patienten dann transplantiert (Abb. 4).

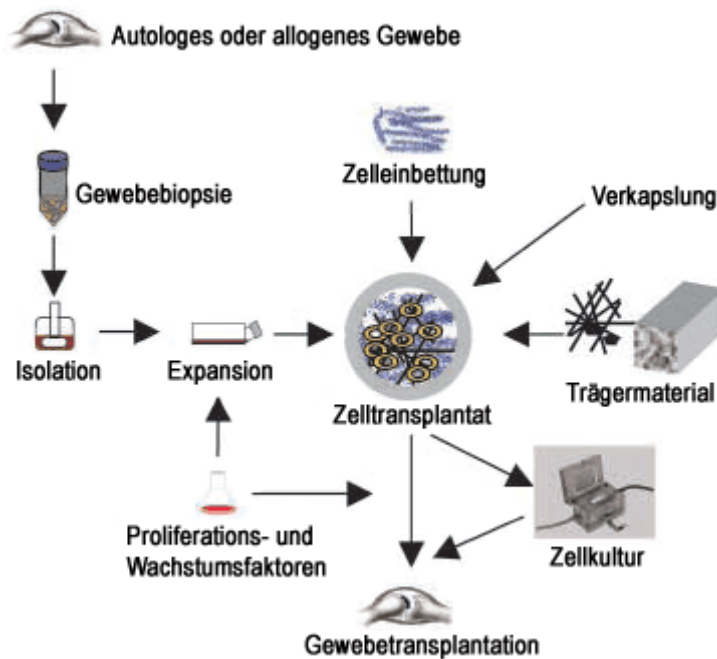
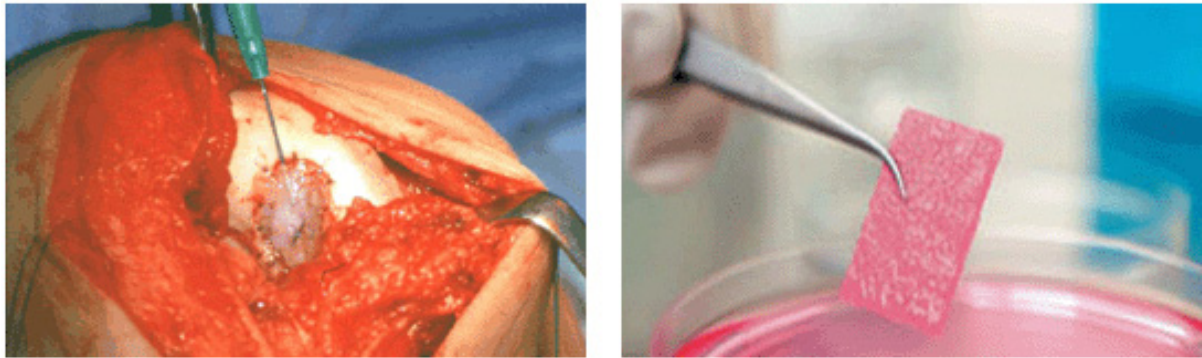


Abb. 4: Allgemeine Prozedur beim Tissue Engineering (Ringe et al., 2002).

Bei Knorpeldefekten kommen dabei als Zellquellen autologe Chondrozyten oder Stamm- und Progenitorzellen mit chondrogenem Potential in Frage. Zusätzlich können noch synthetische oder biologische Träger-, Stütz- und Deckmaterialien zum Einsatz kommen (Sittinger et al., 2004).

### Autologe Chondrozyten-Transplantation

Klinisch von besonderer Bedeutung ist die 1994 von Brittberg et al. beschriebene autologe Chondrozyten-Transplantation. Dafür werden autologe Chondrozyten isoliert, *ex vivo* expandiert und anschließend in den Knorpeldefekt im Knie implantiert. Die Implantation erfolgt entweder als Zellsuspension mit einer periostalen Klappe (Brittberg et al., 1994) oder in Form eines mit autologen Chondrozyten beladenen biokompatiblen Trägermaterials (Abb. 5), was auch schon mit der schonenden arthroskopischen Operationstechnik gelingt (Erggelet et al., 2003).



**Abb. 5:** Unterspritzung des aufgenähten Periostlappens mit autologen Chondrozyten (links); mit autologen Chondrozyten beladenes bioresorbierbares Polymer-Vlies (BioSeed-C®), (rechts).

Die Indikation ist auf fokale chondrale Läsionen beschränkt. Weitgehende degenerative Veränderungen und instabile Bänderverhältnisse stellen in dem betroffenen Gelenk eine Kontraindikation dar (Resinger et al., 2004). Die initial guten Studienergebnisse von Brittberg et al. korrelierten auch langfristig mit guten klinischen Ergebnissen (Peterson et al., 2002; Browne et al., 2005). Dabei zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen der Regeneration des hyalinartigen Knorpels und den guten klinischen Ergebnissen. In einer randomisierten Studie konnten allerdings keine makroskopischen, histologischen oder klinischen Vorteile gegenüber der Penetration subchondralen Knochens mit der Technik der Mikrofrakturierung festgestellt werden (Knutsen et al., 2004).

### **Verwendung mesenchymaler Stammzellen (MSC)**

Bei der autologen Chondrozyten-Transplantation gibt es eine natürliche Begrenzung der Menge autologer Chondrozyten, die man einem Organismus entnehmen kann. Die Entnahme ist mit einem operativen Eingriff verbunden und der Einsatz der Methode ist auf rein chondrale Defekte begrenzt. Eine immer mehr beachtete Alternative stellt die Verwendung von MSC dar. Ohne dem Organismus dauerhaften Schaden zuzufügen, können diese mit einer Knochenmarkspunktion entnommen werden, *ex vivo* expandiert und *in vitro* sowie *in vivo* mit Hilfe geeigneter Differenzierungsfaktoren osteogen oder chondrogen induziert werden (Pittenger et al., 1999). Diese Multipotenz macht MSC für Methoden des Tissue Engineering am Skelettsystem, besonders bei osteochondralen Defekten der Gelenke, interessant. Wakitani et al. implantierte 2002 erstmals autologe humane MSC in Knorpeldefekte medialer Femurkondylen (Wakitani et al., 2002). Dabei handelte es sich um arthrotisch veränderte Kniegelenke, die zeitgleich einer hohen tibialen Osteotomie unterzogen wurden. Die MSC waren dazu in einem Kollagen-Gel eingebettet und

wurden zusätzlich mit einem autologen Periostlappen bedeckt. Im Vergleich zur zellfreien Kontrollgruppe zeigte die Implantation von MSC nach zehn Monaten einen histologisch und arthroskopisch verifizierten verbesserten Gewebeaufbau. Allerdings konnte zwischen den beiden Gruppen kein wesentlicher Unterschied in der Besserung der klinischen Symptomatik festgestellt werden. In zwei Fallbeschreibungen wurden mit der gleichen Methode Knorpeldefekte der Patella therapiert (Wakitani et al., 2004). Hier zeigten die Patienten auch nach fünf Jahren noch eine deutliche Besserung der klinischen Symptomatik. Die Entwicklung und die klinischen Einsätze dieser Methoden stehen noch in den Anfängen. Zahlreiche im Tierversuch erprobte Verfahren MSC zur Therapie von Knorpeldefekten und degenerativen Gelenkerkrankungen zu nutzen müssen sich in der Klinik erst noch bewähren und sich im Vergleich mit schon etablierten Methoden behaupten.

## **1.8 Trägerstrukturen im Tissue Engineering von Gelenk-Transplantaten**

Trägermaterialien bieten Zellen ein dreidimensionales Gerüst, in denen sie anhaften, proliferieren, differenzieren und Matrix produzieren können und unterstützen die Bemühungen komplexe Gewebestrukturen zu erschaffen. Dafür müssen sie bestimmte Voraussetzungen erfüllen (Sittinger et al., 2004):

Trägermaterialien sollten für Nährstoffe und Abfallprodukte durchgängig sein. Sie sollten biokompatibel und bei zunehmender Matrixbildung durch hydrolytische oder enzymatische Mechanismen abbaubar sein. Die Abbauprodukte sollten nicht toxisch sein und vom Körper eliminiert oder verwertet werden können. Letztendlich sollten sie die nötigen physikalischen und mechanischen Eigenschaften für ihren Einsatzort haben. Im Gelenk bedeutet dies, dass Trägermaterialien großen Drücken und Druckveränderungen standhalten müssen.

Es wird an unterschiedlichsten biologischen und synthetischen Trägermaterialien für den Einsatz im Gelenk geforscht. Dabei reicht das Spektrum von injizierbaren Gelen bis hin zu soliden Vliesmaterialien (Sittinger et al., 2004). Zu den am häufigsten verwendeten biologischen Polymeren gehören Materialien, die auf Kollagen oder Glycosaminoglycan basieren. Oft genutzte synthetische Materialien sind PLA (poly-lactid acid), PGA (poly-glycolic acid) und deren Copolymere PLGA (poly-lactic-co-glycolic acid).

Trägermaterialien für die Rekonstruktion von Knochen beinhalten häufig anorganische Verbindungen wie Hydroxyapatit, Calciumphosphat-Zemente, Metalle oder Calciumsulfat. Um den

verschiedenen Materialanforderungen bei osteochondralen Defekten gerecht zu werden, wird an biphasischen Trägermaterialien gearbeitet, die spezifisch jeweils den Knochen- bzw. Knorpelaufbau unterstützen. Interessant sind auch die Ansätze mit mehrlagigen photopolymerisierbaren Hydrogelen (Sharma und Elisseff, 2004). Die Festigkeit dieser Hydrogele lässt sich dabei über UV-Licht steuern. Dies erlaubt das Einkapseln verschiedener Zelltypen in einer zonalen Anordnung und ermöglicht so auch eine örtliche Kontrolle bioaktiver Faktoren.

Erste Studien, die zeigten, dass bioresorbierbare Polymer-Vliese sich als Trägermaterial für humane Knorpelzellen eignen, wurden von Freed et al., 1993 und Sittering et al., 1994 publiziert. Die Knorpelzellen bildeten im Vlies Extrazellular-Matrix, was zur Entstehung neuen knorpelartigen Gewebes führte. Um eine bessere Retention von Zellen und Matrix zu erreichen, wurden die Vlies-Zell-Integrate in Agarosegel verkapselt (Sittering et al., 1994).

Eine viel versprechende klinische Anwendung von Knorpelzellen in Trägermaterialien gelang bei fokalen Knorpeldefekten des Kniegelenks (Erggelet et al., 2003). Weitere Studien sind notwendig, um den klinischen Nutzen und den Vorteil gegenüber weniger aufwendigen Methoden zu zeigen.

Mesenchymale Stammzellen (MSC) zeigten die Fähigkeit in Hyaluronsäure basierten Biopolymeren zu wachsen und Extrazellular-Matrix zu bilden: *In vitro*, MSC von Menschen und Kaninchen; *in vivo*, MSC von Kaninchen (Radice et al., 2000). Bei *in vivo* Studien mit rein Hyaluronsäure basierten Schwämmen (Gao et al., 2001; Solchaga et al., 2000; 2002), wurden autologe MSC von Ratten mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert und anschließend in Hyaluronsäure basierte Schwämme gebracht. Zeitgleich wurden poröse Calciumphosphat-Keramik-Träger mit osteogen stimulierten autologen MSC beladen. Beide Komponenten wurden dann mittels Fibrinkleber zusammengefügt und den Ratten subkutan implantiert. Nach sechs Wochen konnte beobachtet werden, dass beide Komponenten strukturell integriert waren und jeweils knorpel- bzw. knochenartiges Gewebe gebildet hatten (Gao et al., 2001). Im Kaninchenmodell konnten nach zwölf Wochen (Solchaga et al., 2000) und 24 Wochen (Solchaga et al., 2002) osteochondrale Defekte mittels Hyaluronsäure basierten Schwämmen regeneriert werden. Dabei zeigte sich, dass sich das regenerative hyalinartige Knorpelgewebe sehr gut in den hyalinen Gelenkknorpel integrierte. In der Knochen- und Knorpelneubildung war bis auf den schnelleren Start der zellbeladenen Schwämme, histologisch kaum ein Unterschied zwischen den mit autologen MSC beladenen Schwämmen und den leeren Schwämmen zu beobachten. So scheinen die Hyaluronsäure basierten Schwämme auch

allein den Neuaufbau von hyalinartigen Knorpel und dessen Integration im osteochondralen Defekt zu fördern. Weitere Studien sind nötig, um zu klären, ob sich histologisch im längeren Verlauf ein wirklicher Vorteil gegenüber der natürlichen Regeneration osteochondraler Defekte zeigt. Wie in (Kap. 1.6, S. 15) beschrieben, beginnt dieser Regenerationsprozess ja gerade nach zwölf Wochen häufig in einen degenerativen Prozess des Regenerationsgewebes umzuschlagen.

## **1.9 Stammzellen**

### **1.9.1 Probleme und Chancen embryonaler Stammzellen (ESC)**

Die Zahl der Menschen, die an unheilbar degenerativen Erkrankungen leiden, geht in die Millionen. Entsprechend setzen viele Betroffene derzeit große Hoffnungen auf die Erforschung und Nutzung von Stammzellen.

Die Diskussion zur Erforschung und zum Einsatz humaner embryonaler Stammzellen ist wegen des möglichen therapeutischen Nutzens einerseits und der damit verbundenen Embryonenforschung andererseits sehr kontrovers, und die jeweiligen Standpunkte erscheinen unvereinbar.

Menschliche ESC-Linien wurden erstmals 1998 erfolgreich etabliert (Thomson et al., 1998). Hier konnte Thomson auch zeigen, dass humane ESC gutartige Tumore (Teratome) bilden, wenn man sie in Mäuse injiziert. Diese Teratome enthalten recht komplexe Gewebe ekto-, meso- und entodermalen Ursprungs. So waren in ihnen unter anderem Knochen, Zähne, Haarfollikel und Lungengewebe zu finden. Diese Ergebnisse belegen zum einen die Pluripotenz der humanen ESC, weisen aber auch auf eine mögliche Gefahr hin. Sollten sich ESC oder transformierte Abkömmlinge nach einer Transplantation weiterhin in einem undifferenzierten Zustand halten können, bestände die Möglichkeit der Ausprägung lebensbedrohlicher Tumore (Teratokarzinome).

Ein weiteres Problem für den therapeutischen Einsatz von ESC stellen genetische Veränderungen der Zellen in Kultur dar (Schöler, 2004). Geht man von anderen eukaryotischen Zellen aus, wo mindestens eine Mutation pro Zellteilung in das Genom eingebracht wird, bergen ESC aus älteren Kulturen das erhöhte Risiko fataler genetischer Mutationen.

Auch die immunologische Unverträglichkeit zwischen dem Zellspender und dem Empfänger ist eine große Hürde therapeutischer Anwendungen (Schöler, 2004). Sollte das Problem gelöst werden können, wäre der Einsatz gesunder allogener ESC speziell bei genetischen Erkrankungen ein viel versprechender Ansatz.

Die chondrogene Differenzierung von ESC gelang *in vitro* in zwei Schritten. Zuerst wurden die ESC mittels Bone-Morphogenetic-Protein-4 zu mesodermalen Zellen differenziert. Diese ließen sich dann unter Einfluss von Transforming-Growth-Factor- $\beta$ 3 zu Zellen mit chondrogener Aktivität differenzieren (Nakayama et al., 2003). Momentan lässt sich kein Vorteil der ESC gegenüber adulten mesenchymalen Vorläuferzellen im Hinblick auf zukünftliche Therapiestrategien bei degenerativen oder traumatologischen Gelenkerkrankungen erkennen.

### **1.9.2 Hämatopoetische Stammzellen (HSC) und das Phänomen der Konversion**

Die Hoffnung, dass viele Krankheiten eines Tages mit Stammzellen behandelt werden könnten, beruht vor allem auf dem langjährigen Erfolg von Transplantationen des Knochenmarks, in welchem HSC für den Erfolg der Transplantationen verantwortlich gemacht werden. Nach der bisher gängigen Vorstellung hatten HSC, die als adulte Stammzellen zu bezeichnen sind, das Potenzial sich nur entlang der verschiedenen Blutzelllinien zu differenzieren. Für großes Aufsehen sorgten daher Arbeiten der letzten Jahre, die *in vitro* und *in vivo* eine Differenzierungsfähigkeit der HSC auch entlang anderer Zelllinien, wie Muskelzellen, Hepatozyten, Nervenzellen, Mikroglia und Astroglia postulierten (Hennessy et al., 2004). Die Plastizität sich entlang von Zelllinien aller drei Keimblätter zu differenzieren war bisher nur embryonalen Stammzellen zugeordnet und so sprach man in diesen Zusammenhang von Transdifferenzierung oder Konversion.

Die Studien zur Konversion wurden zum Teil heftig kritisiert (Rodic et al., 2004). Alternativ wurden Zellfusionen der HSC mit Zellen des Zielgewebes für das Auffinden von HSC-Strukturen in Organen verantwortlich gemacht. Zwei neue Studien belegen aber ohne Zweifel den Prozess der Konversion von HSC zu Hepatozyten (Jang et al., 2004) und zu verschiedenen Zellen des Nervengewebes (Cogle et al., 2004) ohne Fusion. Letzterer spricht der Zellfusion dennoch eine möglicherweise wichtige Rolle in der Regeneration von Geweben und Zellen zu, die polyploid funktionieren können, wie zum Beispiel Hepatozyten in der Leber oder Skelettmuskulatur.

## **1.10 Mesenchymale Stammzellen (MSC)**

### **1.10.1 Isolierung und Kultivierung von MSC**

MSC können aus dem Knochenmark verschiedener Spezies wie Mensch und Pferd isoliert (Haynesworth et al., 1992b; Fortier et al., 1998), *in vitro* expandiert und zu verschiedenen mesenchymalen Geweben (Pittenger et al., 1999; Worster et al., 2000; Barry und Murphy, 2004) differen-

ziert werden. Pittenger et al. geht dabei von einem Vorkommen von etwa 0,001 – 0,01% aller kernhaltigen Zellen im humanen Knochenmark aus. Mesenchymale Vorläuferzellen sind auch aus anderen Geweben isoliert worden. Dazu gehören: peripheres Blut (Roufosse et al., 2004), Periosteum, trabekulärer Knochen, Fettgewebe, Synovia, Skelettmuskulatur, Lunge und Nabelschnur (Baksh et al., 2004).

1966 beschrieben Friedenstein et al. erstmals knochenbildende Vorläuferzellen aus dem Knochenmark einer Ratte. Schon in diesen ersten Studien definierte man die Eigenschaft der Adhärenz von MSC an Plastikoberflächen als wichtigstes Unterscheidungskriterium zu den meisten hämatopoetischen Zellen und damit auch zum entscheidenden Faktor bei deren Isolation. Die adhärennten Zellen zeigten dabei einen fibroblastoiden Phänotyp. In späteren Studien ließ man die Knochenmarkszellen vor der Kultur über einen Percoll-Gradienten laufen und säte nur die Zellfraktion aus, in der man die MSC vermutete (Haynesworth et al., 1992b). Der entscheidende Isolations-Schritt war aber auch hier die Adhärenz fibroblastoider Zellen an Plastikoberflächen. Die Adhärenz stellt zusammen mit den Expansionseigenschaften und den multipotenten Differenzierungspotential vorläufig die einzigen handfesten Definitionskriterien für MSC dar (Baksh et al., 2004).

In Kultur lassen sich MSC in einem Kulturmedium, welches unter anderem fetales Rinderserum enthält, expandieren (Bruder et al., 1997). Bei der Zugabe von FGF-2 wird eine Erhöhung von 40 PDs (Population Doubling) auf 70 PDs beschrieben, wobei die Differenzierungsfähigkeit dabei bis 50 PDs erhalten bleibt (Bianchi et al., 2003). MSC können ohne den Verlust ihrer Fähigkeiten kryokonserviert werden, so dass die Anlage von Zellbanken möglich ist (Bruder et al. 1997).

### **1.10.2 Charakterisierung von MSC**

Die Analyse von Oberflächenmolekülen hat einige interessante Ergebnisse hervorgebracht. (Tab. 1) zeigt repräsentativ einige Studien dazu.



**Tab. 1:** Zelleigenschaften humaner MSC aus repräsentativen Studien.

Studien	Zelleigenschaften
Pittenger et al., 1999	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adhärenente fibroblastenartige Zellen</li> <li>• CD14<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD106<sup>+</sup>, CD120a<sup>+</sup>, CD124<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup></li> </ul>
Koç et al., 2000	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adhärenente spindelförmige fibroblastenartige Zellen</li> <li>• CD14<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup></li> </ul>
Tse et al., 2003	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CD40<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, MHC-I<sup>+</sup>, MHC-II<sup>-</sup></li> </ul>
Le Blanc et al., 2003	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HLA-I<sup>+</sup>, HLA-II<sup>-</sup></li> </ul>

Man kann erkennen, dass einige der typischen Oberflächenmarker hämatopoetischer Zellen (CD14, CD34, CD45) bei MSC fehlen.

Für unsere Studien besonders interessant ist die Expression des CD44 Rezeptors, der bei Interaktionen mit Hyaluronsäure eine große Rolle spielt (Kap. 1.11.2, S. 34).

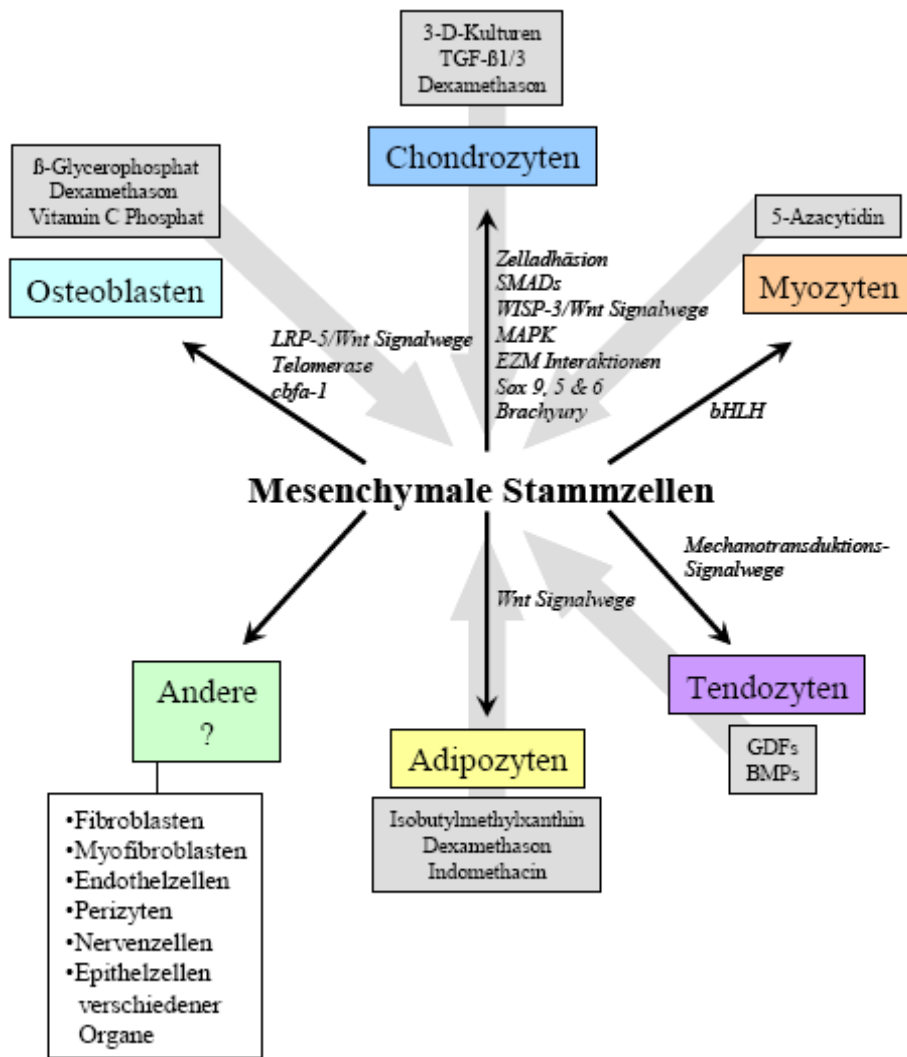
Klinisch bedeutsam ist auch die Ausprägung des immunologischen Phänotyps von MSC (MHC-I<sup>+</sup>, MHC-II<sup>-</sup>, CD40<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>), der auch nach Differenzierung unverändert bleibt. Dieser kann als hypoinmunogen bezeichnet werden. *In vitro*-Stimulationen mit Interferon- $\gamma$  induzierten zwar eine erhöhte Expression von MHC-I und MHC-II. Es fehlten jedoch weiterhin wichtige kostimulierende Moleküle der Immunabwehr (Tse et al., 2003). Erste klinische Versuche mit systemischen Infusionen humaner allogener MSC zeigten keine Immunreaktionen beim Patienten-

ten und bestätigen die Theorie der Hypoimmunogenität (Horwitz et al. 1999; Fouillard et al., 2003).

Bisher wurden für MSC keine spezifischen Markermoleküle und auch keine spezifische Kombination von solchen entdeckt. Da viele der bekannten MSC-Oberflächenmoleküle auch auf anderen Zelltypen zu finden sind, ist bisher keine signifikante Erhöhung der Anreicherung von MSC bei der Isolierung über den Phänotyp gelungen (Javazon et al., 2004).

### **1.10.3 Differenzierung von MSC**

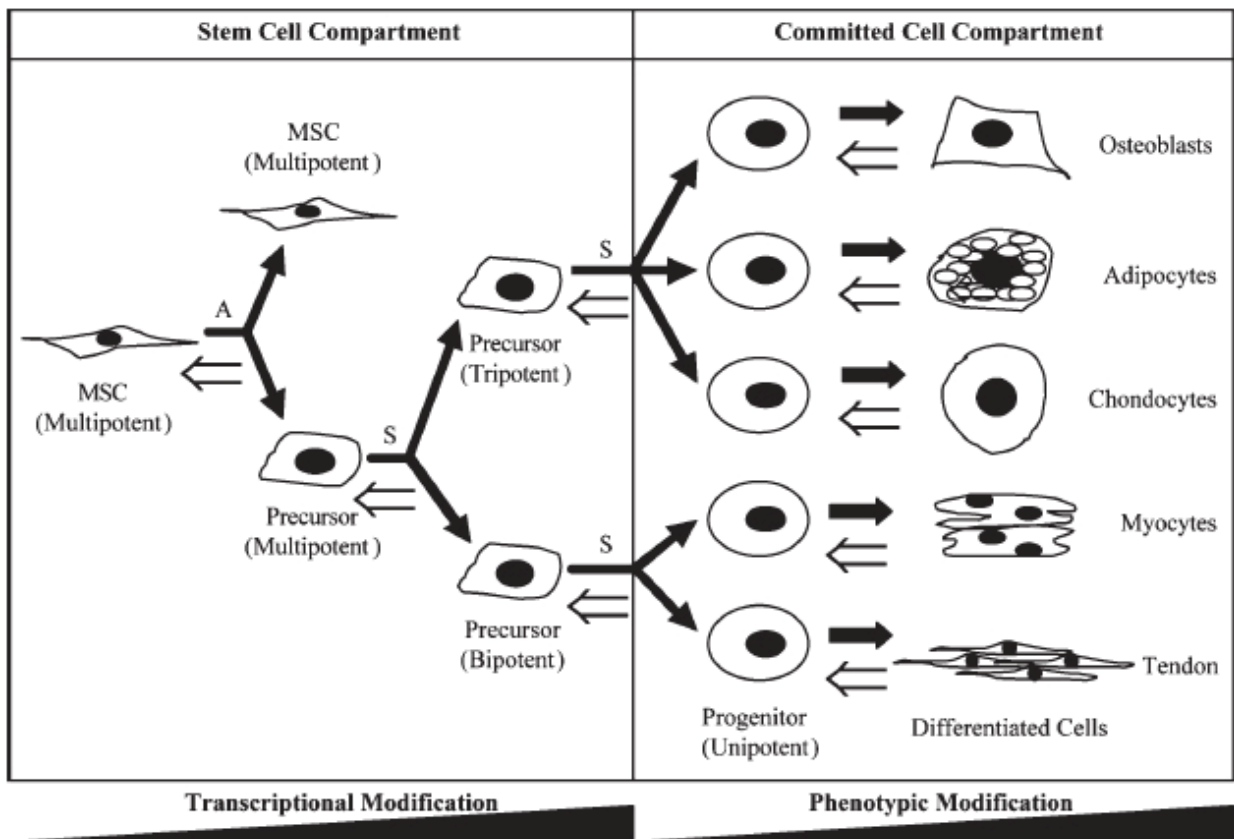
Über die Differenzierung MSC verschiedener Spezies entlang mesenchymaler und nicht mesenchymaler Zelllinien haben zahlreiche Arbeitsgruppen berichtet und deren Ergebnisse sind in guten Übersichtsarbeiten zusammengefasst (Otto und Rao, 2004; Barry und Murphy, 2004; Baksh et al., 2004; Tuan, 2004). (Abb. 6) gibt Auskunft über das in diesen Übersichtsarbeiten beschriebene Differenzierungspotential von MSC in differenzierungsspezifischen Kulturbedingungen sowie über Signalketten, Ereignisse und Komponenten, die sich bei der Differenzierung entwickeln. Dabei werden speziell die Berichte über Differenzierung von MSC entlang nicht mesenchymaler Zelllinien sehr kontrovers diskutiert.



**Abb. 6:** Differenzierungspotential von MSC zu mesenchymalen Geweben. Gezeigt werden einige Kulturbedingungen (grau), die den Differenzierungsprozess entlang einer bestimmten Zelllinie anstoßen (schwarze Pfeile). Wichtige bekannte Signalketten, Komponenten und Ereignisse, die sich dabei entwickeln, sind kursiv unterlegt. Phänomene der Konversion, wie z.B. die Neurogenese werden sehr kontrovers diskutiert (Otto und Rao, 2004; Barry und Murphy, 2004; Tuan, 2004).

Wie bereits erwähnt handelt es sich bei isolierten MSC nicht um eine homogene Zellkultur. Auch Zellkolonien, die sich von einer einzelnen MSC ableiten sind bezüglich ihres Differenzierungspotentials heterogen. So wird berichtet, dass lediglich ein Drittel dieser Zellkolonien tripotent (Chondro-, Osteo-, Adipogenese) ist (Pittenger et al., 1999). Muraglia et al. kommt zu ähnlichen Ergebnissen, wobei die verbleibenden Zellen als bipotent (Chondro-, Osteogenese) und unipotent (Osteogenese) identifiziert wurden (Muraglia et al., 2000). Aufgrund weiterer genetischer Untersuchungen, schlagen Baksh et al. ein Differenzierungsmodell über zwei Ebenen vor (Abb. 7): Auf

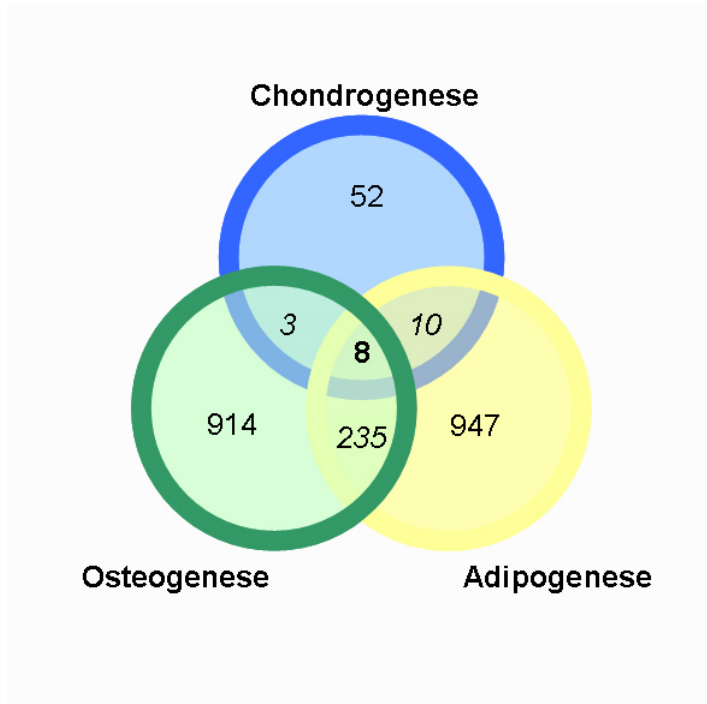
Stammzellebene durchlaufen multipotente MSC unter Stimulation eine Modifikation ihres Gentranskriptions-Repertoires. Ohne erkenntlichen Unterschied im Phänotyp werden dabei durch asymmetrische und symmetrische Zellteilungen weitere Vorläuferzellen generiert. Asymmetrisch bedeutet, dass eine Tochterzelle ein exaktes Replik der Mutterzelle wird, die andere Tochterzelle sich aber zu einer Vorläuferzelle mit eingeschränktem Differenzierungspotential entwickelt. Die zweite Ebene beschreibt Zellen, die sich nach weiteren symmetrischen Zellteilungen auf festgelegten Zelllinien bewegen und als unipotent zu bezeichnen sind. Diese zeichnen sich dann auch zunehmend durch linienspezifische Eigenschaften und charakteristische Phänotypen aus und entwickeln sich zu voll differenzierten Zellen (Baksh et al., 2004). Es zeichnet sich ab, dass voll differenzierte Zellen wieder zu multipotenten Zellen dedifferenzieren können und sich unter geeigneten Bedingungen entlang anderer Zelllinie wieder differenzieren und sogar transdifferenzieren können (Song und Tuan, 2004).



**Abb. 7:** Modelldarstellung der Differenzierung von MSC nach Baksh et al., 2004: Bevor MSC einen spezifischen Phänotyp ausprägen, durchlaufen sie zwei Ebenen. Eine im „stem cell compartment“, die Andere im „committed cell compartment“. Im „stem cell compartment“ kommt es durch asymmetrische Zellteilung (A) zu einer weniger potenten Zellpopulation. Diese führt in Form symmetrischer Zellteilung (S) zu Vorläuferzellen mit vergleichsweise eingeschränktem Differenzierungs- und Erneuerungspotential. Diese tri- oder bipotenten Zellen teilen sich weiter symmetrisch zu bi- und unipotenten Vorläuferzellen im „committed cell compartment“ und entwickeln voll differenzierte Zellen. Es zeichnet sich ab, dass voll differenzierte Zellen wieder zu multipotenten Zellen dedifferenzieren können und sich unter geeigneten Bedingungen entlang einer anderen Zelllinie differenzieren können (offene Pfeile).

Zurzeit sind die Mechanismen, welche die multipotenten MSC entlang dieser zwei Ebenen zu differenzierten Zellen führen nur teilweise verstanden. Interessante Einblicke gewähren Genexpressions-Studien, die linienspezifische Expressionsmuster aufzeigen (Qi et al., 2003; Doi et al., 2004). Um den Ablauf besser zu verstehen, sind aber auch Gene von Interesse, die von verschiedenen Differenzierungslinien gemeinsam hoch reguliert werden (Abb. 8). Die Arbeitsgruppe um Tuan R.S. konnte acht Gene identifizieren, die sowohl bei der Chondrogenese, als auch bei der Osteogenese und Adipogenese hoch reguliert werden. Dabei könnte es sich um übergeordnete Kontroll-Gene handeln, die im Übergangsprozess zur Differenzierung wichtige Funktionen übernehmen. Osteoblasten und Adipocyten teilen auffällig mehr hoch regulierte Gene (235)

bei der Differenzierung, als Chondrozyten mit Osteoblasten (3) oder mit Adipocyten (10). Es ist daher anzunehmen, dass Osteoblasten und Adipozyten eine gemeinsame Vorläuferzelle teilen, während sich Chondrozyten von einer differenten Vorläuferzelle ableiten (Baksh et al., 2004).



**Abb. 8:** Venn-Diagramm, das die Anzahl der Gene illustriert, welche bei Chondrogenese, Adipogenese und Osteogenese von MSC spezifisch oder gemeinsam hoch reguliert werden (Baksh et al., 2004).

#### **1.10.4 Therapeutischer Einsatz von MSC**

Ein Grundgedanke der Stammzelltherapie ist, dass lokal oder systemisch verabreichte Stammzellen aufgrund chemotaktischer Gradienten zum geschädigten Gewebe migrieren und dort aufgrund lokaler Einflussfaktoren zu funktionellen Zellen differenzieren und sich im Gewebeverband integrieren. Erste erfolgreiche klinische Anwendungen von MSC bestätigen diesen Grundgedanken (Tab. 2). Über die spezifischen Faktoren und Mechanismen der Differenzierung *in vivo* ist jedoch nur wenig bekannt.

**Tab. 2:** Therapeutischer Einsatz mesenchymaler Vorläuferzellen.

<b>Indikation</b>	<b>Quelle / Applikationsweg</b>	<b>Ergebnis</b>	<b>Referenz</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Osteogenesis Imperfecta</li> </ul>	Allogene Knochenmarkstransplantation / Infusion	<ul style="list-style-type: none"> <li>Neue dichte Knochenformationen unter Einbeziehung der Spenderzellen</li> <li>Keine Abstoßungsreaktion</li> </ul>	Horwitz et al., 1999
<ul style="list-style-type: none"> <li>Großer Knochendefekt</li> </ul>	Autologe Knochenmarkszellen / Trägermaterial	<ul style="list-style-type: none"> <li>Verbesserte Knochenreparatur</li> </ul>	Quarto et al., 2001
<ul style="list-style-type: none"> <li>Chondrale Defekte des medialen Femurkondylus und der Patella</li> </ul>	Autologe Knochenmarkszellen / Kollagengel / Periostlappen	<ul style="list-style-type: none"> <li>Verbesserter Gewebeaufbau</li> <li>Klinische Verbesserung nur bei Patelladefekten</li> </ul>	Wakitani et al., 2002 und 2004
<ul style="list-style-type: none"> <li>Metachromatische Leukodystrophy und Hurler Syndrom</li> </ul>	Allogene MSC / Infusion	<ul style="list-style-type: none"> <li>Signifikante Verbesserung der Nervenleitgeschwindigkeit</li> <li>Keine Abstoßungsreaktion</li> </ul>	Koc et al., 2002
<ul style="list-style-type: none"> <li>Schwere idiopathische aplastische Anämie</li> </ul>	Allogene MSC / Infusion	<ul style="list-style-type: none"> <li>Verbesserung des Stroma</li> <li>Keine Abstoßungsreaktion</li> </ul>	Fouillard et al., 2003
<ul style="list-style-type: none"> <li>Meniskusverletzungen und Arthroseprävention</li> </ul>	Allogene MSC / Injektion in das Kniegelenk	<ul style="list-style-type: none"> <li>Klinische Studie „Chondrogen TM“ läuft gerade</li> </ul>	Osiris therapeutics®, 2005a
<ul style="list-style-type: none"> <li>Prävention kardialer Dekompensation nach Herzinfarkt</li> </ul>	Allogene MSC / Infusion	<ul style="list-style-type: none"> <li>Klinische Studie „Provacel TM“ läuft gerade</li> </ul>	Osiris therapeutics®, 2005b
<ul style="list-style-type: none"> <li>Akute Graft versus Host Disease</li> </ul>	Allogene MSC / Infusion	<ul style="list-style-type: none"> <li>Klinische Studie „Prochymal TM“ läuft gerade</li> </ul>	Osiris therapeutics®, 2005c



Die Hypoimmunogenität der MSC erlaubt allogene Therapiestrategien, wo mit autologen MSC kein Erfolg zu erwarten ist. Beispielsweise bei Vorliegen genetischer Erkrankungen oder auch fortgeschrittenen degenerativen Erkrankungen des Gelenks. So wird berichtet, dass bei fortgeschrittener Arthrose MSC ein deutlich vermindertes Proliferations- und chondrogenes Differenzierungsvermögen zeigen (Murphy et al., 2002). Die Autoren ziehen bei diesen Ergebnissen in Betracht, dass die in ihren Funktionen eingeschränkten MSC einen wichtigen pathogenetischen Faktor der Arthrose darstellen könnten.

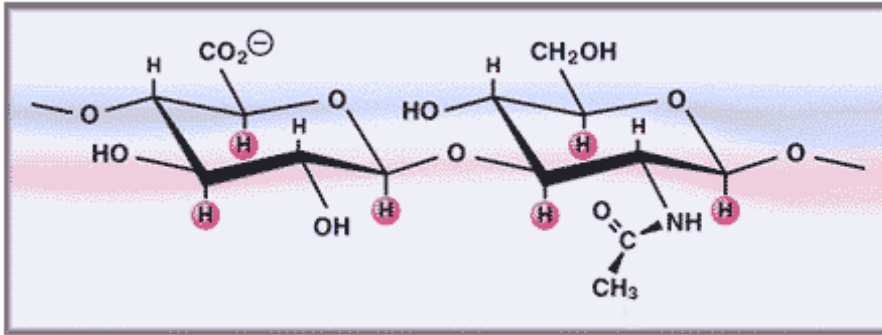
## **1.11 Chondrogenese von MSC**

### **1.11.1 Transforming-growth-factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) als Differenzierungsfaktor**

Im embryonalen Knorpel wird TGF- $\beta$ 1 reichlich gebildet und spielt eine wichtige Rolle in der chondrogenen Transformation von primitiven mesenchymalen Zellkondensationen (Hall und Miyake, 1995). Eine chondrogene Differenzierung equiner MSC konnte bisher in Monolayer-Kulturen mit TGF- $\beta$ 1 induziert werden (Worster et al., 2000). In einer dreidimensionalen Fibrinmatrix gelang dies der gleichen Arbeitsgruppe auch mittels Insulin-like-growth-factor-1 (Worster et al., 2001). In hochdichten 3-D-Kulturen gelang die chondrogene Differenzierung mittels TGF- $\beta$ 1 oder TGF- $\beta$ 3 mit MSC verschiedener Spezies, wie Kaninchen, Mensch und Schwein (Johnstone et al., 1998; Mackay et al., 1998; Ringe et al., 2002). Faktoren wie Bone morphogenetic protein (BMP)-2, -6, und 7 vermögen dort die Knorpelbildung zu verbessern (Sekiya et al., 2001; Schmitt et al., 2003). Hochdichte 3D-Kulturen schaffen gute Voraussetzungen für die Interaktionen der differenzierenden Zellen mit ihrer Mikroumgebung, welche der Chondrogenese förderlich sind (Solursh, 1991; Cancedda, 1995).

### **1.11.2 Hyaluronsäuren als Differenzierungsfaktoren**

Hyaluronsäuren sind uniform repetitive, lineare Glycosaminoglycane, bestehend aus 2.000 – 25.000 Disacchariden (Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin) (Abb. 9) (Weissman und Meyer, 1954).



*Abb. 9: Chemische Struktur der Hyaluronsäure.*

Hyaluronsäure spielt eine wichtige Rolle in der Morphogenese. Dort teilen sich und migrieren Zellen in einer extrazellulären Matrix, die reich an Hyaluronsäure ist. Modulationen in Konzentration und Organisation begleiten die zellulären Veränderungen, die bei der Differenzierung von Geweben und Organen auftreten (Toole, 1981; 1991; 2001). Verschiedene embryonale mesenchymale Zellen, einschließlich der Vorläuferzellen für Knorpel, zeigen eine hydrierte, Hyaluronsäure abhängige perizelluläre Matrix, die rezeptorunabhängig über transmembrane Interaktionen mit Hyaluronsäure-Synthase mit den Zellen verbunden ist (Lee et al., 1993; Knudson und Knudson, 1993). In diesem perizellulären Mantel finden zahlreiche Zellaktivitäten statt, die das Verhalten der Zellen entscheidend beeinflussen. So können sich dort während der Gewebebildung andere Matrixkomponenten sammeln und sich verschiedene Wachstums- und Differenzierungsfaktoren präsentieren, ohne vorerst mit umgebenen Strukturen zu interferieren. Auch bei der Zellproliferation spielt dieser Hyaluronsäure abhängiger Mantel eine wichtige Rolle, indem er ideale Bedingungen für mitotische Prozesse schafft (Brecht et al., 1986). Frühe Mesenchymzellen der Extremitäten-Anlagen werden also mittels Hyaluronsäure abhängiger perizellulärer Matrix, zunächst von Ihrer Umgebung separiert und zur Migration und Proliferation angeregt (Toole, 1991; Maleski et al., 1996a).

Im weiteren Verlauf der Extremitäten-Entwicklung, kommt es an Orten späterer Knorpelbildung zu Kondensationen mesodermaler Zellen, die mit einem deutlichen Rückgang der an Hyaluronsäure reichen interzellulären Matrix einhergeht. Auf den Zelloberflächen bleibt jedoch Hyaluronsäure zurück, welche nun via Rezeptoren der Mesodermzellen zu einer Vernetzung der Zellen im Kondensat führt und Zellinteraktionen ermöglicht, die zur weiteren Knorpeldifferenzierung notwendig sind. Die weitere Differenzierung wird von einer massiven Matrixbildung begleitet. Hyaluronsäuren und Proteoglycane gehören hier zu den Hauptkomponenten. Hyaluronsäuren sind

hauptsächlich über den CD44-Rezeptor mit den Zellen verankert. Proteoglycane lagern sich wiederum mittels eines „Linkprotein“ an die Hyaluronsäuren an (Hardingham, 1981).

Der CD44-Rezeptor gehört zu den wichtigsten Rezeptoren in der Chondrogenese und spielt auch im differenzierten Knorpel eine wichtige Rolle. Er ist an einer großen Bandbreite zellulärer Funktionen beteiligt. Dazu gehören Zellmigration, Zellaggregationen, Retention perizellulärer Matrix, Matrix-Zell und Zell-Matrix Signalübertragungen und Degradierung von Hyaluronsäure (Knudson und Knudson, 1999). Bei der Interaktion von CD44-Rezeptoren auf Chondrozyten und Hyaluronsäure konnte auch eine Erhöhung der TGF- $\beta$ -RNA beobachtet werden (Ishida et al., 1997). Besonders interessant für unsere Studie ist auch, dass der CD44-Rezeptor auf humanen MSC nachgewiesen werden konnte (Pittenger et al., 1999).

*In vitro* konnte in Monolayer-Kulturen gezeigt werden, dass Hyaluronsäure das Potenzial hat Zellen vom Mesenchym der Extremitäten-Anlagen (Stadium 24) chondrogen zu induzieren (Kujawa und Caplan, 1986). Es zeigte sich jedoch eine klare Abhängigkeit vom Molekulargewicht (Kujawa et al., 1986) und von der Konzentration (Maleski et al., 1996b) der Hyaluronsäure zum chondrogenen Induktions-Potential der Hyaluronsäure. Zu große Molekulargewichte und zu hohe Konzentrationen schienen die Zellaggregation zu hemmen, die Voraussetzung zur weiteren Differenzierung ist.

### **1.11.3 Synovialflüssigkeit als Differenzierungsfaktor**

Bei Synovialflüssigkeit handelt es sich um ein Ultrafiltrat des Blutplasmas. Sie enthält Proteine, die elektrophoretisch und immunologisch identisch zu Plasmaproteinen sind. Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist die Hyaluronsäure, die zusammen mit anderen Faktoren wie Glycoproteinen und Proteaseinhibitoren von Synoviozyten sekretiert wird (Drenckhahn, 1994). Synovialflüssigkeit ernährt den Gelenkknorpel, erfüllt wichtige mechanische Eigenschaften als Gelenkschmiere und Stoßdämpfer und beinhaltet verschiedene Wachstumsfaktoren und Hormone. Für einige dieser Faktoren, wie TGF- $\beta$ 1 und Prolactin, konnte bereits eine chondrogene Wirkung auf MSC aufgezeigt werden (Okazaki et al., 2001; Ogueta et al., 2002).

In Monolayer-Kulturen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Synovialflüssigkeit das Potenzial hat Zellen vom Mesenchym der Extremitäten-Anlagen (Stadium 24) chondrogen zu induzieren (Rodrigo et al., 1995). Dabei zeigte sich, dass Synovialflüssigkeit aus Gelenken mit traumatisch bedingten akuten Knorpelschaden Chondrogenese induzieren konnte. Bei Synovialflüssigkeit aus

chronisch verletzten Gelenken kam es dagegen zu einer Inhibition der Chondrogenese. Auch Perichondriumzellen vom Kaninchen konnten *in vitro* und *in vivo* mittels Synovialflüssigkeit chondrogen induziert werden (Skoog et al., 1990). Für die *in vivo* Studien wurden Perichondriumzellen suprapatellar im Kniegelenk des Kaninchens implantiert. Interessante Ergebnisse zeigten intraartikuläre Injektionen mit in Hyaluronsäure suspendierten autologen MSC bei Ziegen (Murphy et al., 2003). Nach künstlich induzierter Arthroseentwicklung durch Resektion der medialen Menisken und des vorderen Kreuzbandes wurde nach sechs Wochen einmalig eine Injektion verabreicht. Im Gegensatz zu den Kontrollen, bildete sich dort am medialen Meniskus Regenerationsgewebe. In diesem konnten die injizierten MSC mittels Fluoreszenz nachgewiesen werden. Auch war im Vergleich zur Kontrollgruppe ein deutlich verlangsamtes Fortschreiten der degenerativen Veränderungen im Sinne einer Arthrose zu beobachten. Diese Ergebnisse führten zur Aufnahme einer klinischen Studie (Tab. 2, S. 26), wo die intraartikuläre Injektion von in Hyaluronsäure suspendierten MSC bei Meniskusverletzungen erprobt wird (Osiris therapeutics, 2005a).

## **1.12 Problemstellung**

Die Nachfrage effizienter Therapiestrategien bei Knorpeldefekten steigt mit der stetig wachsenden Zahl an Patienten, die an degenerativen Erkrankungen des Skelettsystems wie z.B. Arthrose leiden. Auch bei Pferden ist Arthrose häufig Ursache verminderter Leistungsfähigkeit und Krankheit (Jeffcott et al., 1982). Bei Pferden auftretende Arthrose zeigt einen ähnlichen Verlauf wie beim Menschen. Neue therapeutische Strategien, die sich beim Pferd bewähren, wären daher potentiell auch auf den Menschen übertragbar (Frisbie et al., 2001).

Klinische Studien zu den etablierten chirurgischen Verfahren zeigen unbefriedigende Ergebnisse und belegen nur unter Beachtung enger Indikationsstellung für einige Patienten einen Nutzen (Kap. 1.7, S. 16). Inzwischen kommen auch schon Methoden des Tissue engineering mit autologen Chondrozyten zur Anwendung (Kap. 1.7.5, S. 18). Nachteile der klassischen Geweberekonstruktion, wie mangelhafte Knorpelregeneration, die Morbidität autologer Transplantate, Immunreaktionen allogener Transplantate oder das Lockern alloplastischer Transplantate könnten so überwunden werden. Dafür werden autologe Chondrozyten isoliert, *ex vivo* expandiert und anschließend in den Knorpeldefekt implantiert. Allerdings gibt es bei dieser Methode eine natürliche Begrenzung der Menge autologer Chondrozyten, die man einem Organismus entnehmen kann. Auch ist die Entnahme mit einem operativen Eingriff verbunden und der Einsatz der Me-

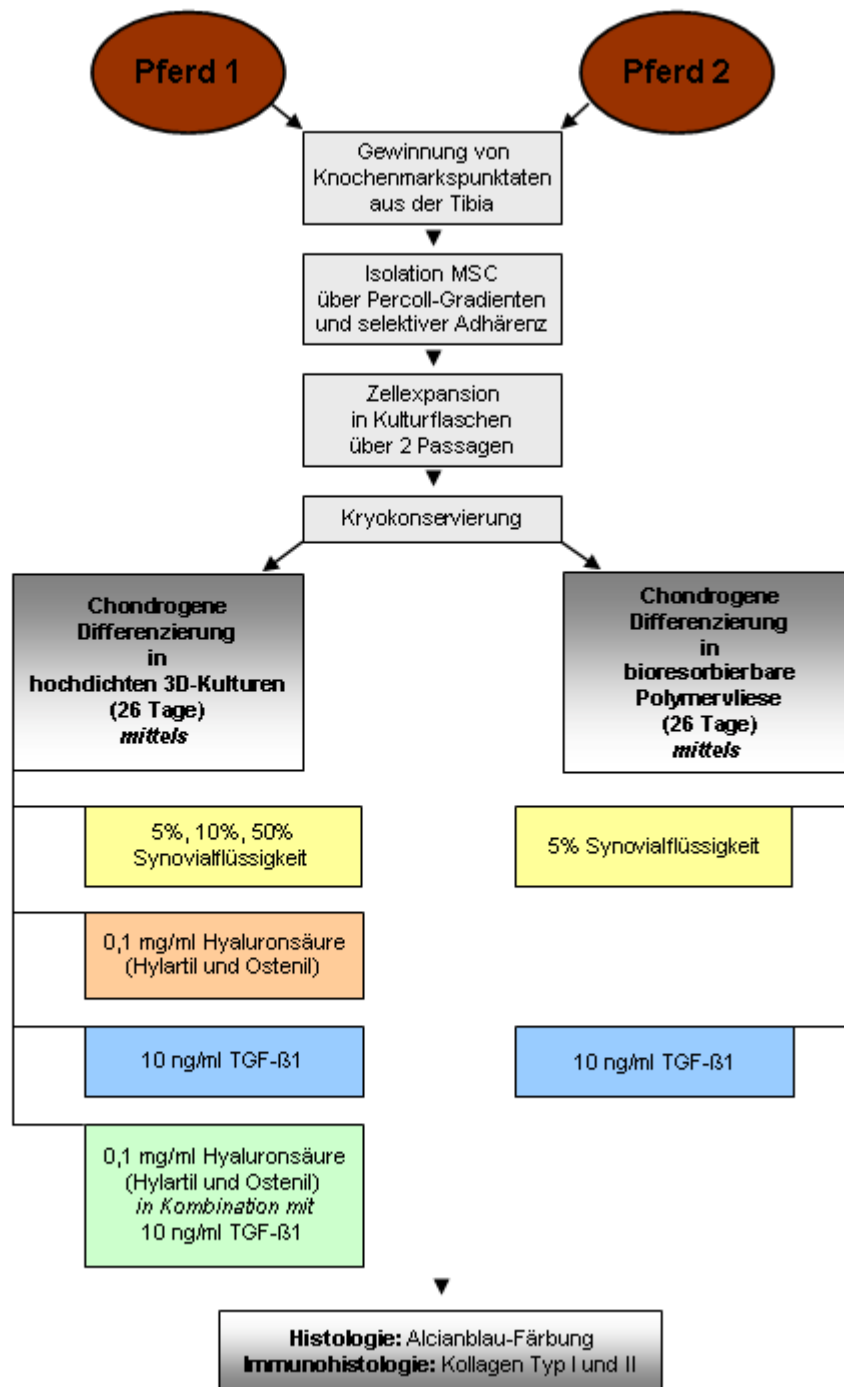
thode auf rein chondrale Defekte begrenzt. Eine immer mehr beachtete Alternative stellen mesenchymale Stammzellen dar (Kap. 1.10, S. 24).

Zunächst haben wir untersucht, ob equine MSC sich wie MSC anderer Spezies verhalten und sich über einen Percoll-Gradienten isolieren sowie in Hochdichte 3D-Kulturen kultivieren und chondrogen induzieren lassen (Kap. 1.10.1, S. 24).

Über die spezifischen Differenzierungsfaktoren und -mechanismen von MSC *in vivo* ist bisher nur wenig bekannt. Bei der therapeutischen Anwendung von MSC im Gelenk kommen diese generell mit Synovialflüssigkeit in Kontakt. Synovialflüssigkeit ist aufgrund seiner Zusammensetzung von Hyaluronsäure und bioaktiver Faktoren (Kap. 1.11.3, S. 36), welche auf die Erhaltung und Regeneration von Knorpelgewebe ausgerichtet sind, ein potentieller Differenzierungsfaktor für die Chondrogenese. Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Synovialflüssigkeit auf das Differenzierungsverhalten von MSC in dreidimensionalen Hochdichte- und Vlies-Kulturen *in vitro* zu untersuchen (Abb. 10).

Hyaluronsäure ist ein wesentlicher Bestandteil der Synovialflüssigkeit und spielt darüber hinaus in der Morphogenese eine entscheidende Rolle bei der Knorpelentwicklung (Kap. 1.11.2, S. 34). Daher haben wir das Potential von Hyaluronsäure untersucht, allein und in Kombination mit TGF- $\beta$ 1, mesenchymale Stammzellen in 3-D-Hochdichte-Kulturen entlang der chondrogenen Linie zu differenzieren (Abb. 10). Dabei wurde auch untersucht, ob Hyaluronsäure in Kombination mit dem etablierten chondrogenen Differenzierungsfaktor TGF- $\beta$ 1 einen synergistischen Effekt zeigt.

Zuletzt wurde untersucht, ob equine MSC sich wie Chondrozyten (Kap. 1.8, S. 21) im bioresorbierbaren Polymer-Vlies dreidimensional kultivieren lassen und unter geeigneten Bedingungen knorpelspezifische Matrix produzieren (Abb. 10).



**Abb. 10:** Übersicht des Studiendesigns. Für die hochdichten 3D-Kulturen wurden ausschließlich Zellen von Pferd 1 genutzt - für die Polymer-Vliese ausschließlich Zellen von Pferd 2.

Um mit in den Hyaluronsäure-Assays (Hylartil® und Ostenil®) vergleichbaren Konzentrationen an Hyaluronsäure zu arbeiten (0,1 mg/ml), wurden 5% Synovialflüssigkeit-Assays angesetzt. Bei einer Konzentration von etwa 2-3 mg/ml Hyaluronsäure in nativer Synovialflüssigkeit (Drenck-